

表 2 各组 HBV-DNA 定量结果 (copy/mL)			
组别	n	试剂 A	试剂 B
HBeAg(+)	86	8.3×10^8	1.2×10^8
HBeAb 组(+)	58	7.5×10^5	1.8×10^5
HBeAg(-)HBeAb 组(-)	16	4.2×10^4	1.1×10^4

3 讨 论

目前定量检测 HBV-DNA 的方法有很多种,罗氏试剂检测因具有较高的灵敏度、精密度、可重复性好和较宽的定量范围,被国际公认为 PCR 定量方法的参比试剂。由于其成本高、价格贵,在国内大医院或科研机构应用较多,而一般医院仍以国产试剂为主。用于检测 HBV-DNA 最广泛的方法是采用 FQ-PCR,生产检验试剂的厂家很多,各厂家之间还没有统一的检测标准^[8-9]。本文从临床实验室用户的角度来探讨 2 种不同厂家的试剂检测结果是否存在差异。A 试剂检测下限为 1.28 IU/mL,其采用一种全新的免核酸提取的扩增方式,又称“一步法”病原体核酸荧光定量 PCR 检测方法,整个标本处理和检验过程在 1 个 PCR 反应管中即可完成,且无需离心、振荡、更换离心管等操作,不但简化了操作步骤、节省了耗材成本,而且减少了加热、移液等导致核酸丢失与污染的操作步骤,标本中的核酸全部参与到 PCR 反应中,与传统方法比较,每批检测可提前近 2 h 报告结果。B 试剂采用传统的“浓缩煮沸法”,检测下限为 500 IU/mL,标本处理包含沉淀、高速离心等过程,核酸容易丢失,获得率低,且步骤繁杂费时。

对 2 种试剂检测 160 份标本的结果进行比较和相关性分析,发现 2 种试剂均值差异无统计学意义($P>0.05$),但从表 1 可以看出,由于样本处理步骤繁杂,导致核酸的丢失,试剂 B 结果较试剂 A 偏低;同时试剂 B 有 1 例 1.3×10^3 copy/mL 结果,A 试剂检测为阴性,提示有污染可能。同一份标本用 2 种试剂检测,A 试剂的检测值大于 B 试剂。以 10 倍梯度稀释的乙型肝炎患者阳性血清,考查 2 种试剂的灵敏度,A 试剂可测至 10^7 倍稀释水平,B 试剂仅可测至 10^6 倍稀释水平,说明 A

• 检验仪器与试剂评价 •

试剂在灵敏度上更高。

综上所述,在 2 种试剂对比中,B 试剂存在纯化标本步骤繁琐、核酸易丢失、获得率低且费时、报告周期长等缺点。而 A 试剂采用“一步法”免核酸纯化的方法,核酸获得率高,操作简便,并具有很高的灵敏度和准确度,具有较高的临床应用和推广价值。

参考文献

[1] Ganem D,Prince AM. Hepatitis B virus infection—natural history and clinical consequences[J]. N Engl J Med,2004,350(11):1118-1129.

[2] Tangkijvanich P,Sa-Nguanmoo P,Mahachai V,et al. A case-control study on sequence variations in the enhancer II/corepromoter/precure and X genes of hepatitis B virus in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Hepatol Int,2010,4(3):577-584.

[3] Yim HJ,Lok AS. Natural history of chronic hepatitis B virus infection:what we knew in 1981 and what we know in 2005[J]. Hepatology,2006,43(2):173-181.

[4] Lai CL,Ratziu V,Yuen MF,et al. Viral hepatitis B[J]. Lancet,2003,362(9401):2089-2094.

[5] Lee WM. Hepatitis B virus infection[J]. N Engl J Med,1997,337(24):1733-1745.

[6] Hochberger S,Althof D,Gallegos de Schrott R,et al. Fully automated quantitation of hepatitis B virus (HBV) DNA in human plasma by the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan system[J]. J Clin Virol,2006,35(4):373-380.

[7] 中华医学会肝病分会,中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 中华肝脏病杂志,2005,13(12):881-891.

[8] 李金明,王露楠,邓巍. 标本处理对聚合酶链反应测定乙肝病毒核酸的影响[J]. 中华检验医学杂志,2000,23(6):337-339.

[9] 李金明. 聚合酶链反应临床应用的优越性和局限性[J]. 中华检验医学杂志,2005,28(3):225-227.

(收稿日期:2012-09-18)

LightCycler 480 II 型实时荧光定量 PCR 仪性能评价

方 莉^{1,2},汤洪波²,许 媛¹,贺 巧²,赵维姣¹,姜远凤²,唐 中^{1,2△}
(1. 川北医学院附属医院检验科,四川南充 637007;2. 川北医学院医学检验系,四川南充 637007)

摘 要:目的 对 Roche LightCycler480 II 型实时荧光定量 PCR 仪(Roche 480)主要性能指标进行评价,为该仪器检测结果的可靠性提供依据。方法 按照美国临床实验室标准化委员会(CLSI)文件制定的评价标准,分别对 40 例标准血清和 40 例临床标本定量检测 HBV-DNA,评价其精密度、准确度、灵敏度、线性和可比性。结果 精密度:批内变异系数(CV_{批内})为 1.40%~2.10%,批间变异系数(CV_{批间})1.17%~1.40%,总变异系数(CV)为 1.40%~1.83%;准确度:与标准品比较,相对偏差为 0.35%~0.41%;灵敏度:对血清 HBV-DNA 浓度大于或等于 4×10^3 IU/mL 的标本检出率为 100%,对血清 HBV-DNA 浓度为 4×10^2 IU/mL 的标本检出率为 90%;线性:相关系数为 0.999,直线回归方程为 $Y=1.007 3X-0.048 7$;Roche 480 和 Roche Light-Cycler 1.2(Roche1.2)2 台 PCR 仪的可比性: $P=0.113$,相关系数为 0.995,线性比对直线回归方程为 $Y=0.923 0X+0.339 7$ 。结论 Roche 480 具有良好的精密度、准确度、灵敏度、线性,与 Roche 1.2 检测系统有良好的相关性,能够满足临床需要。

关键词:聚合酶链反应; 实验室; 性能评价

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.02.039 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2013)02-0207-03

疗效监测及预后起着重要的指导作用^[1]。有报道称在临床治疗过程中,如果患者血中 HBV-DNA 载量下降 2 个 Log 值甚至低于检测下限,说明抗病毒治疗有效;如果患者用药 3 个月 后病毒载量无下降,说明抗病毒治疗无效^[2]。因此,检测结果的准确度对临床诊断和科研工作都尤为重要。2012 年 4 月笔者对川北医学院附属医院新引进 Roche 480 实时荧光定量 PCR 仪进行了主要性能指标的评价实验,以此了解该仪器的分析性能和诊断性能,为临床提供可靠的实验数据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 临床标本来源于川北医学院附属医院门诊和住院患者,收集 40 例经本院 Roche 1.2 荧光定量 PCR 仪检测,HBV-DNA 浓度为 10³~10⁷ IU/mL 的非脂血、溶血的乙型肝炎患者血清标本,分装在已灭菌的 1.5 mL EP 管内,置于-20℃冰箱保存备用。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 Roche 480 实时荧光定量 PCR 仪(Roche 公司)、LightCycler 1.2 实时荧光定量 PCR 仪(Roche 公司)、生物安全柜、恒温金属浴、低温高速离心机等。

1.2.2 试剂 HBV 核酸定量检测试剂盒及 HBV-DNA 标准品均由上海科华生物工程股份有限公司提供,批号均为 20110721。

1.3 方法

1.3.1 精密度实验 按照 CLSI 文件制定的评价标准,在 Roche 480 实时荧光定量仪上检测 4×10⁴、4×10⁶ IU/mL 两种浓度的标准血清,完成批内和批间的重复测定。批内精密度实验在相同条件下对同一标本在尽可能短的时间内测定 40 次;批间精密度实验每天测 1 次,连续测定 40 d,分别计算批内和批间的平均值、标准差、变异系数及总变异系数。

1.3.2 准确度实验 取 4×10⁴、4×10⁶ IU/mL 两种浓度的标准血清各 40 份,在 Roche 480 实时荧光定量仪上各检测 1 次,计算其平均值,并分别与标准血清定值相比较,计算相对偏差。

1.3.3 灵敏度实验 分别取 4×10⁴、4×10³、4×10² IU/mL 三个浓度的标准血清各 40 份,在 Roche 480 实时荧光定量仪上分别检测 1 次,根据其阳性检出率判断其灵敏度。

1.3.4 线性测定 分别取 4×10⁷、4×10⁶、4×10⁵、4×10⁴、4×10³ IU/mL 的标准血清,在 Roche 480 上检测 1 次,将检测值和预测值做直线相关及回归分析得出相关系数和线性方程。

1.3.5 比对实验 根据 EP-9A 文件的要求,将 40 例临床血清标本在两台仪器上进行平行检测,每天测量 8 个标本,每台仪器每份标本测量 2 次,第 1 次测量顺序:为 1~8,第 2 次测量顺序:8~1,两次测量时间间隔大于 2 h,连续测量 5 d,取两次测量的平均值作为比对结果,计算其相关性^[3]。

1.4 统计学处理 所有计量资料经对数转换后采用 Excel2007 软件、SPSS 17.0 软件进行直线相关及回归分析、配对 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Roche 480 精密度和准确度 批内变异系数(*CV*_{批内})为 1.40%~2.10%,批间变异系数(*CV*_{批间})为 1.17%~1.40%,总变异系数(*CV*)为 1.40%~1.83%,2 种浓度的 HBV-DNA 在 Roche 480 上检测的 *CV*_{批内}、*CV*_{批间} 均符合卫生部标准,见表 1。与标准品比较,两个浓度检测结果的准确度为 0.35%~0.41%,符合卫生部标准。

2.2 灵敏度 对 HBV-DNA 浓度大于或等于 4×10³ IU/mL

的标准血清的检出率为 100%,对 HBV-DNA 浓度为 4×10² IU/mL 检出率为 90%。

表 1 Roche 480 精密度实验结果

HBD-DNA (IU/mL)	批内		批间		CV (%)
	$\bar{x} \pm s$	<i>CV</i> _{批内}	$\bar{x} \pm s$	<i>CV</i> _{批间}	
	(copy/mL)	(%)	(copy/mL)	(%)	
4×10 ⁴	4.48±0.10	2.10	4.58±0.05	1.17	1.83
4×10 ⁶	6.61±0.09	1.40	6.63±0.09	1.40	1.40

2.4 线性测定 将 5 个浓度梯度的 HBV-DNA 标准品在 Roche 480 上检测后,得出直线回归方程:*Y*=1.007 3*X*-0.048 7(*r*=0.999)。

2.5 比对实验 将 40 例符合要求的临床实验标本按照上述实验方法进行检测,对两组平均值进行配对 *t* 检验,*P*=0.113,提示 Roche 480 与 Roche 1.2 的检测结果差异无统计学意义;其线性比对回归直线方程:*Y*=0.923 0*X*+0.339 7(*r*=0.995),提示两台仪器具有良好相关性。

3 讨论

近年来荧光定量 PCR 技术广泛应用于临床多种病原体的检测^[2-6]。它不仅灵敏度高、特异性好、误差低,而且避免交叉污染和环境污染,在很大程度上弥补了定性 PCR 的缺点^[5]。Deback 等^[7]指出,Roche 480 型实时荧光定量 PCR 仪对测量人巨细胞病毒、EB 病毒、HHV-6、BK 病毒负荷是一个灵活的 PCR 技术平台。Roche 480 型实时荧光定量 PCR 仪使用宽光谱、高强度的氙灯作为光源,实现最佳的荧光激发效率,采用 Thermo-Base™热循环技术和先进的光学检测系统,结合独特的散热器和高性能风扇保证散热的快速,确保均一的孔间温度,彻底消除边缘效应。

Roche 480 精密度实验表明,在 10⁶ IU/mL 数量级和 10⁴ IU/mL 数量级上 *CV*_{批内} 和 *CV*_{批间} 值均小于 5%,具有较好的精密度,符合卫生部标准。灵敏度方面,Roche 480 在 HBV-DNA 浓度大于或等于 4×10³ IU/mL 时检出率均为 100%,在浓度为 4×10² IU/mL 时检出率高达 90%,而造成假阴性的原因可能与操作过程中不可避免的随机误差及标本本身的因素有关。本实验所用 Roche 480 与杜琼等^[4]提到的 ABI7700、ABI7500 相比,灵敏度有所提高,提示其在检测临床病原体的检出率较高。线性实验使用涵盖临床上绝大多数阳性标本浓度范围(10³~10⁷ IU/mL)的 5 个浓度梯度的标准品,测得其相关系数为 0.999,线性方程为 *Y*=1.007 3*X*-0.048 7,为 PCR 定量提供参照标准,使得定量更加准确。按照 CLSI 的 EP9-A2 文件要求,比对试验 *r*>0.95 为相关良好。本实验中,Roche 480 与 Roche 1.2 相比,检测结果的相关系数为 0.995,相关性良好;配对 *t* 检验 *P*=0.113,提示两台 PCR 仪检测结果差异无统计学意义,均能用于临床标本的检测。

综上所述,Roche LightCycler 480 II 型实时荧光定量 PCR 仪的精密度、准确度、灵敏度均达到卫生部的标准,线性范围较宽,与 Roche 1.2 检测系统有良好的相关性,能满足临床分子生物实验室的要求。

参考文献

[1] 程钢,何蕴韶,周新宇. 荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒[J]. 中华医学检验杂志,1999,22(3):135-138.
[2] 曾争,刘丹,公维波,等. 三种 PCR 仪的特异性及灵敏度评价[J].

- 医疗卫生装备, 2006, 27(10): 61-63.
- [3] 郭华国, 姚正国. 脂质、血红蛋白、胆红素标本对乙肝病毒 DNA 荧光定量测定的影响[J]. 微循环学杂志, 2006, 16(1): 32-33.
- [4] 杜琼, 倪滔, 刘小琦, 等. ABI7700、7500 荧光定量 PCR 仪性能评价[J]. 实用医院临床杂志, 2009, 6(1): 63-64.
- [5] Castelain S, Descamps V, Thibault V, et al. TaqMan amplification system with an internal positive control for HCV RNA quantitation[J]. J Clin Virol, 2004, 31(3): 227-234.
- [6] Boutolleau D, Deback C, Géli J, et al. Evaluation of the LightCycler 480 real-time PCR system for the measurement of CMV,

EBV, HHV-6 and BKV viral loads in whole blood[J]. Pathol Biol (Paris), 2010, 58(2): 166-169.

- [7] Deback C, Géli J, Ait-Arkoub Z, et al. Use of the Roche LightCycler 480 system in a routine laboratory setting for molecular diagnosis of opportunistic viral infections: Evaluation on whole blood specimens and proficiency panels[J]. J Virol Methods, 2009, 159(2): 291-294.

(收稿日期: 2012-09-12)

• 检验仪器与试剂评价 •

CA7000 全自动凝血仪性能验证

陈渊博, 郑文婷, 尹志军, 隋 洪[△], 张瑞雄

(中山市小榄人民医院检验科, 广东中山 528415)

摘要:目的 验证 Sysmex CA7000 全自动凝血仪的系统性能, 确定该检测系统是否稳定、准确、可靠。方法 从变异系数(CV)、准确度、检测限、线性范围、携带污染率、干扰实验等方面对 Sysmex CA7000 进行验证。结果 批内最大 CV 值 9.25%、批间最大 CV 值 7.38%; 准确度最大偏倚为 8.87%; 检测限的最大 CV 值为 12.14%; FIB 的相关系数为 0.997 2、D-二聚体(D-D)的相关系数为 0.999 7; 携带污染率最大值为 -1.82%; 干扰试验的最大偏离值为 1.80%, 验证全部通过。结论 Sysmex CA7000 凝血仪是一个精密度好、准确度高, 检测范围宽, 携带污染率低, 抗干扰能力强的检测系统。

关键词: Sysmex CA7000; 性能验证; 干扰试验

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.02.040

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)02-0209-03

Sysmex CA7000 凝血分析仪是一部集凝固法、发色底物法和免疫法于一体, 采用散射光加百分比测定原理的全自动凝血仪。为保证检验质量, 笔者根据《临床检验质量管理技术基础》、《临床检验方法确认与性能验证》和《医学实验室质量管理与认可指南》的相关规定^[1-3], 对该仪器进行系统评价, 包括变异系数(CV)、准确度、线性范围、携带污染率、干扰实验等指标。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 Sysmex CA7000 全自动凝血仪。试剂、校准品、质控品: 为 Sysmex CA7000 配套产品。干扰检查 A 试剂盒由日本希森美康株式会社生产, 含以下干扰物: 胆红素(3 320 μ mol/L), 溶血血红蛋白(48.3 g/L), 乳糜(15 300 FTU 福尔马肼浊度数)。

1.3 方法

1.3.1 精密度验证 批内精密度: 根据 CLSI EP15-A 文件^[4], 取 2 个水平的标本, 同一批次尽可能短时间内连续重复测定 20 次, CV 值必须小于或等于厂家的要求。(2) 批间精密度: 参照 CLSI EP5-A 文件^[5-6], 选取正常水平(Citrol-1)、异常水平(Citrol-2), 分别分装成 5 份, 冻存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱内。每天取出 2 个水平的质控, 分别测定 2 批次, 每批次测 2 遍, 2 次间隔大于 2 h, 连续测定 5 d, 计算 SD 和 CV, CV 值必须小于或等于厂家的要求。

1.3.2 准确度验证 分别取 2 个水平的定值质控品(Citrol-1、Citrol-2)验证凝血四项的准确度, D-二聚体(D-D)专用质控品验证 D-D 的准确度, 每个结果重复测定 3 次, 结果应在质控品标识的可控范围内, 偏倚应在厂家标识的 $\pm 10\%$ 范围内; 同时结合 2010 年卫生部临检中心凝血室间质量评价结果进行评价。

1.3.3 检测限验证 只验证以浓度为结果的项目, 将 FIB 和 D-D 的标准品分别使用配套 OVB 稀释液稀释到厂家标识的浓度检测低限值附近, 重复检测 10 次, 记录结果, 计算 CV, 应在厂家标识的 $\pm 20\%$ 范围内, 该浓度即为该项目的检测下限。

1.3.4 线性验证 只验证以浓度为结果的项目, 选取 1 份接近预期上限的高值血浆样本(H), 分别按 100%、80%、60%、40%、20%、10% 的比例进行稀释, 每个稀释度重复测定 3 次, 计算均值。将实测值与理论值作比较(偏离应小于 10%), 计算回归方程 $Y=aX+b$, 厂家要求 a 在 1 ± 0.05 范围内, 相关系数 $r \geq 0.975$ 。

1.3.5 携带污染验证 (1) 高值样本对低值样本的污染: 将低值样本(N)置样本架 1 和 3 位置, 高值样本(A)置于 2 位置, 每个样本分别测定 3 次, 记录结果: N1、N2、N3、A1、A2、A3、N4、N5、N6。计算: $k1 = [N4 - \text{Mean}(N1, N2, N3)] / \text{Mean}(N1, N2, N3)$, 应符合厂家标识的 $\pm 10\%$ 范围内。(2) 低值样本对高值样本的污染: 将高值样本置样本架 1 和 3 位置, 低值样本置于 2 位置, 每个样本分别测定 3 次, 记录结果: A1、A2、A3、N1、N2、N3、A4、A5、A6。计算: $k2 = [A4 - \text{Mean}(A1, A2, A3)] / \text{Mean}(A1, A2, A3)$, 应符合厂家标识的 $\pm 10\%$ 范围内。

1.3.6 干扰试验验证 分别使用标准干扰物血红蛋白、胆红素、乳糜按一定比例加入正常混合血浆, 以原混合血浆作为空白对照, 分别测定 PT、APTT、FIB、TT, 每个样本重复检测两次取均值, 计算偏离值, 偏离值应符合厂家标识的 $\pm 10\%$ 范围内, 用以评价溶血、胆红素及乳糜对检测结果的影响程度。

1.4 统计学处理 采用 PSS11.0 统计软件进行统计学处理。

2 结果

2.1 精密度验证 批内、批间 CV 结果见表 1, 检测结果均小于厂家标识的要求, 验证通过。

[△] 通讯作者, E-mail: 1191390393@qq.com。